

食品中の核酸成分に関する研究*—Ⅳ

食用きのこの加工における核酸成分の消長（その1）

毛利 威徳 橋田 度 志賀 岩雄

STUDIES ON NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN FOODSTUFFS.—Ⅳ.

CHANGES OF NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES DURING THE PROCESSING OF EDIBLE MUSHROOMS. I

Takenori Mouri, Wataru Hashida, and Iwao Shiga

Fractions of nucleoside polyphosphate in perchloric acid extracts of Shii-take (*Lentinus edodes*) and common mushroom (*Psalliota bisporus*) were separated and analysed by means of a large scale Dowex 1×8 column. These fractions were identified as ADP (adenosine diphosphate), ATP (adenosine triphosphate), and GDP (guanosine diphosphate).

In a previous report (This Journal, 42, 434 (1964), it was observed that the level of 5'-nucleotides of some mushrooms extracted with boiling water was higher than that extracted with cold perchloric acid. Related to this observation, some factors involved in boiling extraction were investigated. The amount of 5'-nucleotides was the highest when mushrooms were extracted at 60-70°C, and it increased over a 30 min. period. The increase of 5'-nucleotide in *P. bisporus* was accompanied with the decrease of ATP and ADP. Accumulation of 5'-AMP represented the increase of 5'-nucleotide in such case. It is assumed the during the boiling of *P. bisporus* at under 70°C, 5'-AMP increased as the result of enzymatic breakdown of ATP and ADP, rather than from thermal destruction. The increase of 5'-nucleotides in boiling extract of Shii-take may depend on the breakdown of its own ribonucleic acid as well as that of ATP and ADP.

結 言

きのこ類の核酸成分，就中 5'-スクレオチド類の分布については，前報で紹介したように数々の報告がある。そしてシイタケおよびマッシュルームなどを冷時過塩素酸抽出するよりも，煮出し抽出（熱水抽出）をする方が遊離 5'-スクレオチド類が多いことが認められている。一方蔬菜類，水産

* 本研究は大阪大学工学部醗酵工学教室教授寺本四郎先生との協同研究である。ご恵的な御助言御協力を賜ったことに深謝致します。醗酵工学 43 巻 5 号 P. 335 (1965) 所載。

脚註：本報においては次の略号を使用する。

5'-AMP: adenosine-5'-monophosphate (5'-adenylic acid)

5'-GMP: guanosine-5'-monophosphate (5'-guanylic acid)

A D P: adenosine diphosphate

A T P: adenosine triphosphate

G D P: guanosine diphosphate

物、マッシュルームなどの缶詰製造工程において、予備蒸煮および加熱殺菌に際して、固型物中の 5'-AMP などの含量が変化し、ある場合にはむしろ増加することが認められた。²⁾

このように食品の加工工程中に加熱処理に際して、核酸成分の変化が認められ、呈味成分として重要な 5'-ヌクレオチド類の消長は食品化学の観点からも興味深いと考えられるので、比較的に遊離核酸成分含量の高いシイタケ、マッシュルームを対象にして、塩基類、ヌクレオチド類、高分子核酸類の相対的な消長を検討した。なお 5'-ヌクレオチドが遊離状態で存在する原因としては高分子核酸の分解、ヌクレオチド誘導体よりの生成、de novo 生合成などが考えられるが、本報では nucleoside polyphosphate よりの生成の可能性について検討した。

実 験 の 部

1. 実 験 方 法

1.1 供試標準物質

定性、定量のための標準物質として 5'-ヌクレオチド、3'-ヌクレオチドはいずれもナトリウム塩を武田薬品工業株式会社研究所より提供された。またポリホスフェート類、ヌクレオチド類、核酸塩基類は市販品を用いた。

1.2 試料調製法

供試きのこはつぎのごときものである。学名は文献によった。シイタケ (*Lentinus edodes*)、通称マッシュルーム (*Psalliota bisporus*)。³⁾

シイタケは市販品、マッシュルームは当研究所試作品でいずれも可食部をできるだけ均一に取り細断した後種々の条件で処理しホモジナイズした。冷却しながら等量の10%過塩素酸溶液、つぎに5%溶液で繰り返し抽出し 5N-KOH で中和して試料とした。

1.3 分 析 方 法

総 5'-、3'-ヌクレオチド量は中島らの酵素法によった。¹⁾ すなわち、5'-、あるいは 3'-ヌクレオチダーゼを作用させ遊離する磷酸量を定量した。個々のヌクレオチドは Dowex 1×8 を用うるカラムクロマトグラフィーによった。なおシイタケ、マッシュルームのポリホスフェートの画分を同定するために径 2 cm、長さ 30 cm のカラムを用いた。カラムからの溶出位置が 260 m μ の吸収を peak とするフラクションを集めて濃縮し同定した。

2. 実 験 結 果

2.1 生マッシュルーム、生シイタケ各画分の同定

生マッシュルームおよび生シイタケの抽出液の塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド類は前報で報告したのでここではヌクレオシドポリホスフェートの画分について同定した。¹⁾

まず生マッシュルーム 200 g を冷時過塩素酸抽出を行ない 5N-KOH にて中和後冷時遠心分離し上澄液を集め前報通り大型カラム (2×30 cm) を通過させた。そのクロマトグラムは Fig. 1 のごとくである。

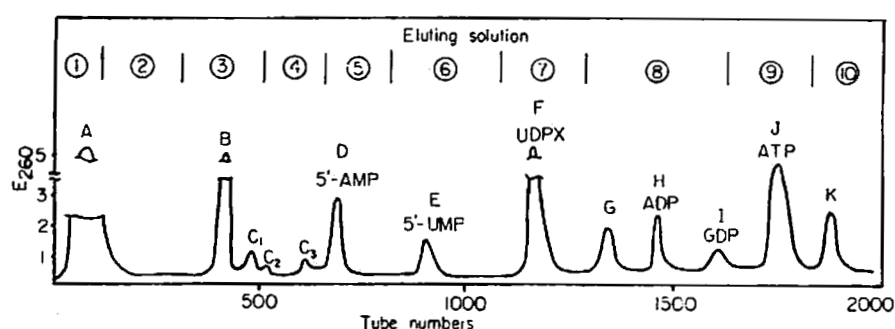


Fig. 1. Chromatogram of perchloric acid-extract of raw mushroom (*P. bisporus*) (A large scale column).

画分が6個 (F, G, H, I, J, K) 得られた。画分 H, I, J の紫外吸収曲線と燐酸、塩基、リボースのモル比は Fig. 2 と Table 1 のごとくで 260 m μ 附近に最大吸収を示し核酸成分であると考えられる。

ペーパークロマトグラフィーの結果は Fig. 3 のごとくである。

画分 H, I, J は溶媒 (2, 3, 4) (前報参照) いずれによってもおのおの ADP, GDP, ATP と一致すること、および 100°C, 3 時間分解することによって 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-AMP に一致すること、また 5'-ヌクレオチダーゼを作用させると分解されておのおの アデノシン, グアノシンを生成すること、そして 1 N-HCl で分解することによって アデニン, グアニンが生成されることから H は ADP, I は GDP, J は ATP であることが認められた。

生シイタケについてもマッシュルームと同様に同定した。このクロマトグラムは Fig. 4 のごとくである。画分 H, I, J の紫外吸収曲線と燐酸、塩基、リボースのモル比は Fig. 5 と Table 2 のごとくである。

ペーパークロマトグラフィーの結果は 100°C, 3 時間分解, 5'-ヌクレオチダーゼによる分解, また HCl 分解についてもマッシュルームと同様の結果で、これらから画分 H を ADP, I を GDP, J を ATP と同定した。

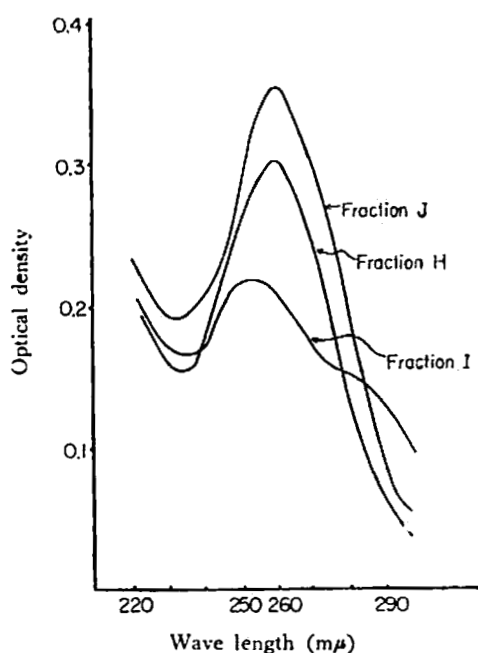


Fig. 2. Absorption curves of mushroom fractions H, I, and J.

Table 1. Molar ratio of ribose and phosphate to base in mushroom fractions H, I and J.

Fraction	Base	Ribose	Phosphate
H	1.00	0.90	2.10
I	1.00	0.89	1.89
J	1.00	0.89	2.98

2.2 生マッシュルーム、生シイタケの煮出し温度の影響

まず種々の条件下で煮出した場合の総 5'-ヌクレオチド量の変化をしらべた。煮出し法はおおのこの温度に約 80 ml の水を温めた中に細断し均一にした試料を 10 g 入れ、5 分間保温抽出しその煮出し液を冷時 5% 過塩素酸溶液で処理し洗液ともに 100 ml とした。対照として細断きのこ試料を冷時過塩素酸で抽出したものを取った。その結果はマッシュルームは Table 3、シイタケは Table 4 のごとくである。

シイタケでは 60°C ~ 70°C で 5'-ヌクレオチド量が最も多く 100°C 抽出および冷時過塩素酸抽出の場合よりも多かった。マッシュルームでも 70°C が最高であるが低温の場合に比べてシイタケの場合ほど大き

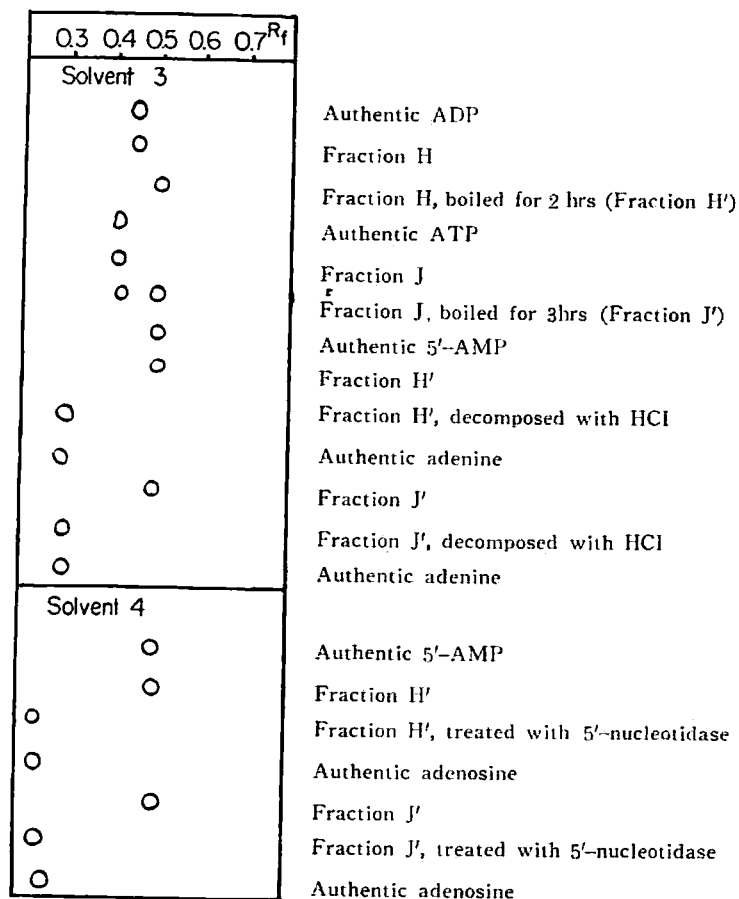


Fig. 3. Identification of mushroom fractions H and J by paper chromatography.

Solvent 3: isopropanol; conc. HCl; Water

Solvent 4: saturated ammonium sulfate; 1M-sodium acetate; isopropanol

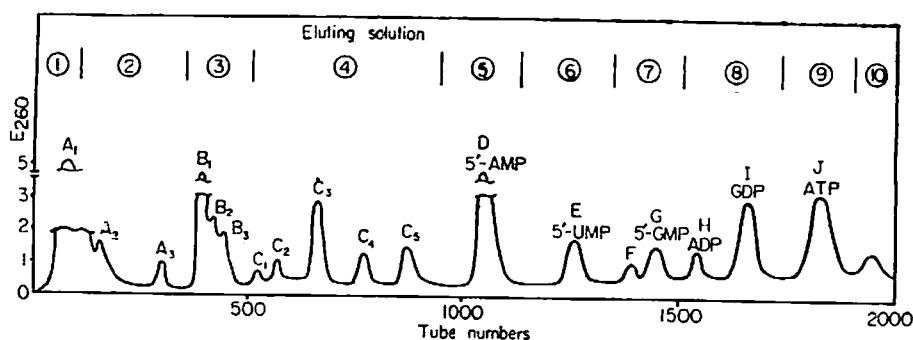


Fig. 4. Chromatogram of perchloric acid-extract of raw Shii-take (*Lentinus edodes*) (A large scale column).

い差はない。また 3'-スクレオチドはほとんど認められなかった。

このように 70°C でシイタケ、マッシュルームいずれも 5'-スクレオチドが多いことよりその抽出時間について検討した。

2.3 生マッシュルーム、生シイタケの煮出しによる経過時間に伴う変化

試料の煮出し法は 70°C で時間を 5 分～30 分まで変化させた。煮出し液の調整法は煮出し温度の影響の時と同じである。その結果は生マッシュルームでは Table 5、生シイタケでは Table 6 のごとくである。

70°C で時間経過に伴って、シイタケでは 5'-スクレオチドが増加しているがマッシュルームでは少しは増加をしているがシイタケほど増加はなかった。煮出し抽出において、時間経過によってかなり抽出量が増加することと 70°C に最高値があるということは単なる物理的な抽出

現象のほかには酵素反応も存在するのではないかと考えられる。

そのモノスクレオチドの多い原因が何に由来するものかが興味深いと思われる。

2.4 マッシュルーム缶詰工程における 5'-スクレオチドの消長

マッシュルーム缶詰製造工程は Fig. 6 のごとくで常法通りに従った。

原料ブランチング後の固型物、加圧殺菌後の固型物と液汁についておのおの 5'-スクレオチド量を測定した結果は Table 7 のごとくである。

これらはいずれも過塩素酸抽

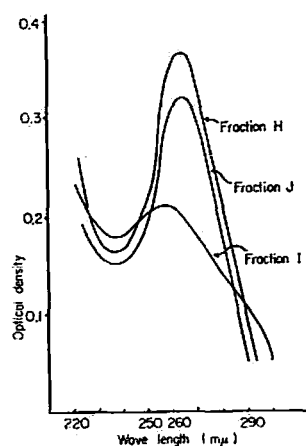


Fig. 5. Absorption curves of Shii-take fractions H, I and J.

Table 2. Molar ratio of ribose and phosphate to base in Shii-take fractions H, I and J.

Fraction	Base	Ribose	Phosphate
H	1.00	0.85	1.90
I	1.00	0.82	1.85
J	1.00	0.80	2.85

Table 3. Effect of temperature on the formation of nucleotides in boiled extract of mushroom.

Boiling condition	5'-Nucleotide μmole/g dry wt.	3'-Nucleotide μmole/g dry wt.
Cold perchloric acid-extraction	2.86	0
30°C, 5 min	1.94	0
50°C, "	3.48	0
70°C, "	4.08	0
100°C, "	3.34	0

Table 4. Effect of temperature on the formation of nucleotides in boiled extract of Shii-take.

Boiling condition	UV ₂₆₀ /100mg dry wt.	5'-Nucleotide μmole/g dry wt.	3'-Nucleotide μmole/g dry wt.
Cold perchloric acid-extraction	53.7	1.97	0
30°C, 5 min	27.8	1.47	0
50°C, "	42.3	4.77	0
60°C, "	69.7	16.60	0
70°C, "	71.7	13.90	0
80°C, "	70.5	9.80	0
100°C, "	59.5	4.16	0

出したものであるが、g 当り μ mole で比較してブランチング後のものが原料の約 3 倍に達することが認められた。これは高分子核酸、または ATP, ADP などのポリホスフェートの分解に基づくのではないかと考えられる。殺菌後の固型物中には 1/2 量の 5'-スクレオチドが見出された。なお一缶当りで総 5'-スクレオチド量を比較すると殺菌前の固型物中の 5'-スクレオチドは殺菌後の固型物 + 液汁中の 5'-スクレオチドにほぼ等しいがこれには殺菌時の煮熟による高分子核酸またはポリホスフェートよりの分解による生成と缶詰殺菌に伴う 5'-スクレオチドの破壊とが相伴ってこのような結果になったものと思われる。

2.5 生マッシュルーム、生シイタケの煮出しに伴う個々のスクレオチド組成の変化

上述のごとく煮出したまたは缶詰製造における 5'-スクレオチド量の変化、多くの場合は増加という現象はきわめて興味深いものであるが、その原因についてここではスクレオチドポリホスフェートよりの生成という点に焦点をしばって検討した。

生マッシュルームについて、原料をそのまま試料とするとともに、それを水から煮て 100°C で 3 分間煮出しを行ない液汁と固型物とに分けて試料にした。それぞれについてカラムクロマトグラ

Table 5. Effect of incubation time on the formation of nucleotides in boiled extract of mushroom.

Boiling condition	UV ₂₅₀ /100mg dry wt.	5'-Nucleotide μ mole/g dry wt.	3'-Nucleotide μ mole/g dry wt.
Cold perchloric acid-extraction	104	3.12	0
70°C, 1 min	103	2.93	0
" , 5 min	116	3.96	0
" , 20 min	124	4.16	0
" , 60 min	124	4.56	0
100°C, 5 min	115	3.02	0

Table 6. Effect of incubation time on the formation of nucleotides in boiled extract of Shii-take.

Boiling condition	UV ₂₅₀ /100mg dry wt.	5'-Nucleotide μ mole/g dry wt.	3'-Nucleotide μ mole/g dry wt.
Cold perchloric acid-extraction	65	3.27	0
70°C, 1 min	74	5.98	0
" , 3 min	80	8.00	0
" , 5 min	80	9.61	0
" , 10 min	91	9.81	0
" , 20 min	88	12.8	0
" , 60 min	103	19.0	0
100°C, 3 min	79	4.96	0

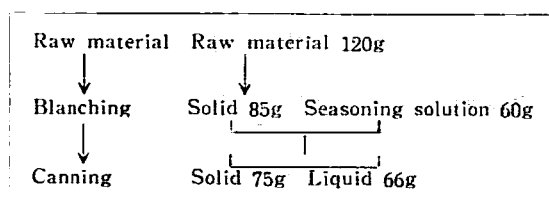


Fig. 6. Outline of mushroom canning process.

Table 7. Changes of the total 5'-nucleotides in canning processes of mushroom.

	Sample applied g	5'-Nucleotide μ mole/g	Content per can	Total 5'-nucleotide μ mole/can
Raw material	5.00	0.145	120	17.4
Solid, after blanching	3.5	0.415	85	35.2
Solid, after canning	3.27	0.222	79	17.5
Liquid, after canning	2.76	0.251	65.5	17.8

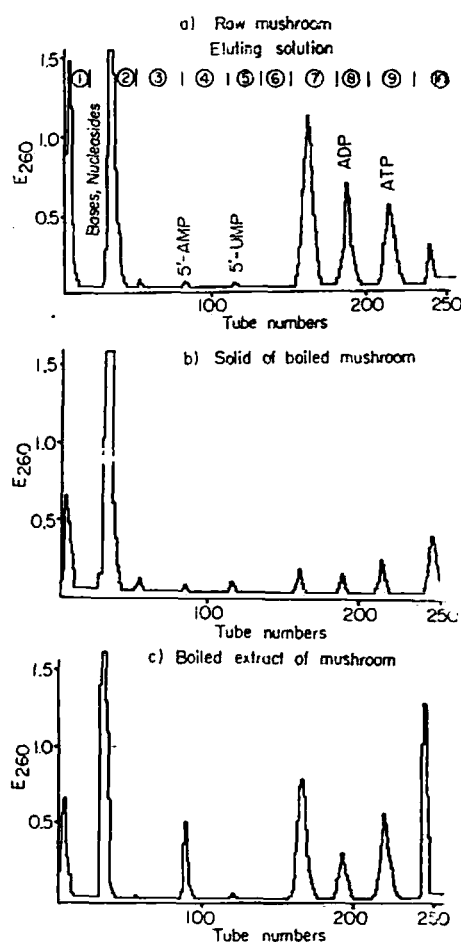


Fig. 7. Chromatogram of perchloric acid extract of mushroom.

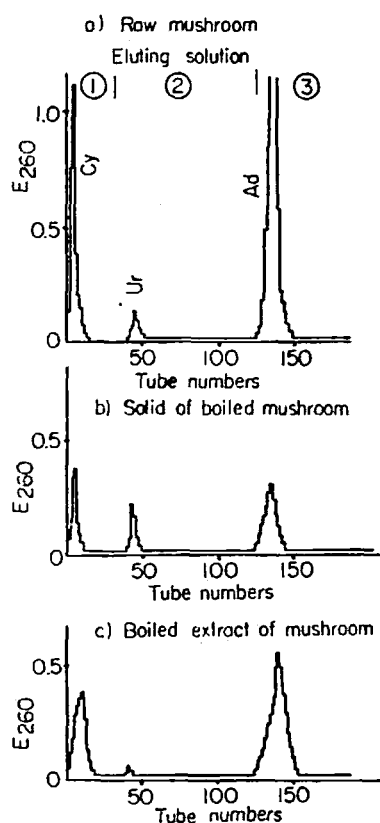


Fig. 8. Chromatogram of bases and nucleosides of mushroom.

フィでスクレスチド組成をしらべた結果は Fig. 7 のごとくで、さらに塩基、スクレオシド画分の再クロマトグラフィを行なった結果は Fig. 8 のごとくである。

個々の含量を計算すると Table 8 のごとくである。

これよりマッシュルームの煮出しにおける 5'-スクレオチドの増加は、5'-AMP の増加が主体をなしていること、それと同時に ATP, ADP が煮出しに伴って減少することが認められた。ATP, ADP の減少に伴って 5'-AMP の形で蓄積されるのではないかと考えられる。

生シイタケの場合もマッシュルームと同様に、ATP, ADP などポリホスフェートの分解も見出された。しかし量的には少なく Table 4 で認められたような 5'-スクレオチドの著量の生成を説明するには充分ではない。

このようにマッシュルームではポリホスフェートよりの分解と 5'-AMP の生成蓄積が主体であると思われるが、この際マッシュルーム自身の酵素系が関与するか否かについて次項のごとく検討した。

Table 8. Amounts of individual nucleotide in boiled extract of mushroom.

Sample		Bases and Nucleosides	5'-AMP	5'-UMP	Frac. E	ADP	ATP
Raw mushroom	Distribution of UV ₂₆₀ (%)	40.1	0.48	0.50	13.6	7.82	14.1
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.32	0.42		3.84	6.6
Solid of boiled mushroom	Distribution of UV ₂₆₀ (%)	68.8	1.15	2.20	1.2	1.44	1.2
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		0.36	0.76		0.46	0.38
Extract of boiled mushroom	Distribution of UV ₂₆₀ (%)	40.2	6.30	0.92	16.9	6.88	11.4
	$\mu\text{mole/g dry wt.}$		2.33	0.49		2.40	4.62

Distribution of UV₂₆₀ (%): % of absorbancy at 260m μ of each fraction to a total absorbancy of the sample which was applied on column.

2.6 ATP, ADP および 5'-GMP に対するマッシュルーム抽出液の作用

マッシュルームについて、ATP, ADP より 5'-AMP の生成がそれ自身の酵素系によるのではないかと、の観点から、マッシュルームの水抽出液を粗酵素液として ATP に作用させてその生成をカラムクロマトグラフィでしらべた。なおマッシュルームにおいては遊離の 5'-GMP が見出されていないことに関連して、5'-GMP を分解する酵素系の有無についてもしらべた。

粗酵素液はきのこ（子実体）を 2 倍量の蒸留水で氷冷しながらホモジナイズし、遠心沈澱してその上澄液をとったものである。酵素反応は次のようにして行なった。すなわち

粗 酵 素 液	5 ml
基 質 (ATP 0.2% 溶液)	5 ml
0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0)	5 ml

上記の混合液を 37°C で 60 分間反応せしめた。反応液を常法によってカラムクロマトグラフィを行なった結果は Fig. 9 のごとくであり、これから各成分の含量を計算すると、Table 9 のごとくである。

未反応液および死活化した粗酵素液を添加した反応液では核酸成分は ATP が主要なものである。反応後は ATP が減少してほとんど見出されず、ADP, 5'-AMP, nucleoside, 塩基成分の生成が認められた。これからマッシュルームの抽出液には、ATP を分解し ADP を経て 5'-AMP を生成する adenosinetriphosphatase 系およびそれらに分解する phosphatase あるいは nucleosidase 系が存在することが推察される。

なお基質を 5'-GMP 溶液として粗酵素液を作用させる場合は Fig. 10 のごとくであり、その核酸成分含量は Table 10 のごとくである。

マッシュルームには 5'-GMP を分解してグアノシン（あるいはグアニン）を生成する酵素系の存在が推察される。

なお生しいけの水抽出液についての結果も Table 9, Table 10 に示した。その作用活性での強弱は簡単には論じられないが、ATP 分解系、5'-GMP 分解系酵素の存在はマッシュルームの場合

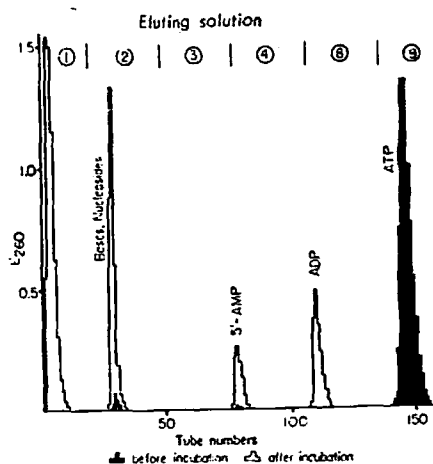


Fig. 9. Chromatogram of mushroom's crude enzyme extract on authentic ATP.

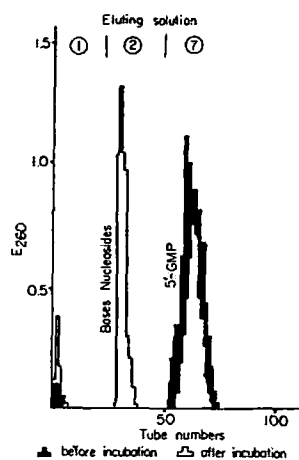


Fig. 10. Chromatogram of Shii-take's crude enzyme extract on authentic 5'-GMP.

Table 9. Formation of nucleotides by crude enzyme extract incubating with authentic ATP.

	Distribution of UV ₂₆₀ (%)			
	Bases and nucleosides	5'-AMP	ADP	ATP
Boiled (inactivated) enzyme and ATP	trace	0	0	97.8
Enzyme extract (mushroom) and ATP	27.9	11.9	33.2	trace
Enzyme extract (Shii-take) and ATP	13.1	12.8	10.6	4.1

Distribution of UV₂₆₀ (%): % of absorption of each fraction to a total absorption of sample.

Table 10. Formation of bases and nucleosides by crude enzyme extract incubating with 5'-GMP.

	Distribution of UV ₂₆₀ (%)	
	Bases and nucleosides	5'-GMP
Boiled (inactivated) enzyme and 5'-GMP	0	99.4
Enzyme extract (mushroom) and 5'-GMP	35.6	64.3
Enzyme extract (Shii-take) and 5'-GMP	58.6	25.4

Distribution of UV₂₆₀ (%): % of absorption of each fraction to a total absorption of sample

合と同じく推察できる。

考 察

Bergkvist⁵⁾ は数種のきのこにおいて、ADP、GDP および ATP を見出しているが、私達はマッ

シュルूम、シイタケにおいてもこれらの存在を認めた。

マッシュルूम、シイタケの煮出しによって 5'-スクレオチドが増加することは興味深い⁶⁾が、その原因として2、3の機構が考えられる。私達はまず ATP、ADP よりの 5'-AMP の生成の可能性についてしらべた。マッシュルूमの場合は、きのこ中の ATP が酵素分解を受けて ADP を経て 5'-AMP になると考えられ、かつカラムクロマトグラフィにより 5'-AMP の増加が認められた。加熱による分解も考えられるが、粗酵素液による分解が認められるので ATP 分解酵素系の活動が考えられる。すでに adenosinetriphosphatase が広く生物界に存在することはよく知られており、水産食品や鳥獣肉類において 5'-AMP の生成経路はこれによると説明されている^{7,8)}。私達はマッシュルूमにおいてもこの経路によって ATP が減少し、5'-AMP が生成するもの⁹⁾と考える。

シイタケ煮出しの場合は 30°C に対して 60°C では約15倍も抽出量が増加した。これは温度に敏感な酵素系の存在を推察させるものであり、また 5'-AMP 以外の他の 5'-スクレオチドの増加も認められることから、ATP 分解系以外にリボ核酸分解系の活動が予想される。この問題について次報で検討したい。

マッシュルूमには 5'-GMP はほとんど認められず、シイタケには 5'-GMP が著量見出されている。(前報参照) GDP からの 5'-GMP の生成については、phosphatase の問題も含めて後程検討したい。

煮出し液において 5'-GMP や 5'-AMP の増加することは、食品調理の観点からも注目すべきことと考えられる。

要 約

Dowex 1×8 を用うる大型カラム (2×30 cm) によって前報に引続き、スクレオンドポリホスフェート画分について同定した。シイタケおよびマッシュルूम抽出液より ATP、ADP および GDP の存在を認めた。

マッシュルूम、シイタケよりの煮出しにおいて抽出される総 5'-スクレオチド量に対しては温度の大きい影響があり 60°C ~ 70°C で60分の時が最も 5'-スクレオチド量が多かった。このような 5'-スクレオチドの増加の原因の一つとしてポリホスフェートからの分解が考えられ煮出しにおいては ATP、ADP の分解に伴う 5'-AMP の増加が認められた。

マッシュルूमにおいては主体は ATP、ADP の分解に伴う 5'-AMP の増加と考えられるが、シイタケについては ATP、ADP の分解を考慮しても 5'-スクレオチド量の増加が著しく大きく、これが核酸分解酵素系の作用によるか否かについては後報で検討したい。

終りに臨み、貴重な薬品、酵素類など多大の御援助を賜った武田薬品工業株式会社の方々、および実験に協力された当短大青山延子、寺田潤子嬢に深謝致します。

本報は昭和39年度日本農芸化学大会で発表した。

- 1) 橋田, 毛利, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 42, 434 (1964)
- 2) 橋田, 毛利, 志賀, 寺本, 西川: 昭和38年度日農化大会 (1963, 4月, 東京), 橋田, 毛利, 志賀, 寺本: 昭和38年度日本醗酵工学会大会 (1963, 11月, 大阪), 毛利, 寺田, 橋田, 志賀: 日本栄養食糧学会近畿支部第3回研究発表会 (1964, 11月, 西宮), 毛利, 青山, 橋田: 日本缶詰協会技術会第13回大会 (1964, 4月, 山形)
- 3) 今関, 本郷: 原色日本菌類図鑑 (1957), 河村: 日本菌類図説 (1929)
- 4) 中島ら: 農化, 37, 558 (1963)
- 5) Bergkvist, R.: *Acta Chem. Scand.*, 12 1549, 1554 (1958)
- 6) 斎藤: 化学, 15, 101 (1960), 日本会誌, 27, 461 (1961)
- 7) 島蘭: *Amino acid and Nucleic acid* (醗酵と代謝), No. 10, 179 (1964)
- 8) 寺崎ら: 昭和39年度日農化大会 (1964, 7月, 札幌)
- 9) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醗酵工学, 43, 344 (1965)